

ÜBER DEN EINFLUSS VON PHYTOL AUF DEN LEBERLIPIDGEGHALT
NORMALER UND ALLOXANDIABETISCHER RATTEN

vorgelegt von
Knut Rainer Mildner

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

Direktor: Prof. Dr. P. Schölmerich

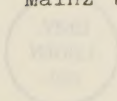
ÜBER DEN EINFLUSS VON PHYTOL AUF DEN LEBERLIPIDGEGHALT
NORMALER UND ALIXANDIABETISCHER RATTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Knut Rainer Mildner
aus Trachenberg

Mainz 1971



Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

Referent: Prof. Dr. G. J. Kremer

Korreferent: Prof. Dr. P. Schölmerich

Tag der mündlichen Prüfung: 18.4.1972



gesamtherstellung
ditters bürodienst
mainz



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. PROBLEMSTELLUNG UND LITERATURÜBERSICHT	2
C. MATERIAL UND METHODIK	9
1. Versuchstiere	9
2. Gewinnung der Gesamtlipide	10
3. Bestimmung der einzelnen Lipidfraktionen	11
a) Glyceridbestimmung	11
b) Phospholipidbestimmung	12
c) Cholesterinbestimmung	12
4. Analyse des Fettsäuremusters	12
D. STATISTIK	13
1. Berechnungen	13
2. Methoden der statistischen Auswertung	14
E. VERSUCHSERGEBNISSE	15
1. Beobachtungen an den Versuchstieren	15
2. Einzelergebnisse der Untersuchungen	16
3. Beschreibung und statistische Auswertung der gefundenen Ergebnisse	19
4. Ergebnisse der Gaschromatographie	21
F. DISKUSSION	26
G. ZUSAMMENFASSUNG	33
H. LITERATURVERZEICHNIS	34

A. EINLEITUNG

Phytol ist eine Substanz, die in der Natur weit verbreitet ist. Es ist mit Chlorophyll, einem Bestandteil grüner Pflanzen, verestert und stellt auch die Seitenkette gewisser Vitamine dar.

Nach Aufnahme in den tierischen Organismus kann es unter bestimmten experimentellen Bedingungen den Lipidgehalt in der Leber verändern. In der Pathologie des Menschen ist die Refsum-Krankheit (Heredopathia atactica polyneuritiformis) bekannt, bei der ein Umwandlungsprodukt des Phytols, die Phytansäure, in abnorm hoher Menge in den Organlipiden vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von Phytol auf den Gesamtlipidgehalt und auf das Verteilungsmuster der Lipidfraktionen Triglyceride, Phospholipide und Cholesterin in der Rattenleber untersucht werden. Versuchstiere sind gesunde, normal ernährte Ratten und alloxandiabetische Ratten.

B. PROBLEMSTELLUNG UND LITERATURÜBERSICHT

1953 hatten Bernhard und Ritzel (7) bei Verfütterung von Phytol an cholinfrei ernährte Ratten eine eindeutige Verminderung der bei Cholinmangel eintretenden Leberverfettung (Best und Huntsman (9)), also eine lipotrope Wirkung des Phytols gefunden. Wird jedoch Phytol einer normalen Nahrung oder einer fettreichen Nahrung bei Ratten beigelegt, so kann es eine gegenteilige Wirkung haben und zu einer Erhöhung des Lipidgehaltes in der Leber führen (Avigan (3), Klenk und Kremer (23) und Steinberg et al. (33)).

Klenk und Kahlke (22), die über eine Anhäufung von Phytansäure in den Cholesterinestern und in den anderen Lipidfraktionen der Organe bei einem Patienten mit Symptomen des Refsum-Syndroms erstmals berichteten, fanden auch einen erhöhten Gesamtlipidgehalt der Leber dieses Patienten. Eine solche Vermehrung des Fettgehaltes der Leber stellt ein nicht obligates, jedoch mehrfach beobachtetes Symptom dieser seltenen Erkrankung dar, wovon auch bei Cammermeyer (12), Kremer (24), Reese und Bareta (28) und Richterich et al. (29) berichtet wird. Es erscheint möglich, daß ein Zusammenhang zwischen der Anhäufung der Phytansäure im Organismus dieser Patienten und der Zunahme des Fettgehaltes der Leber besteht. Diese Phytansäure wird zum Teil direkt aus der Nahrung aufgenommen, zu einem großen Teil wird sie jedoch aus aufgenommenem Phytol gebildet (Klenk und Kremer (23), Steinberg et al. (34) und Stoffel und Kahlke (36)). Eine in vivo Synthese der Phytansäure erscheint nach Steinberg et al. (35) unwahrscheinlich.

Der von Bernhard und Ritzel (7) gefundene lipotrope Effekt des Phytols wurde unter recht unphysiologischen Bedingungen beobachtet. Die Versuchstiere erhielten eine Nahrung, in der eine wichtige Substanz, das Cholin, fehlte. Die lipotrope Eigenschaft des Phytols bei diesen Cholinmangelratten zeigte sich bei täglichen oralen Gaben von 50 bis 80 mg Phytol. Die Verminderung des Fettgehaltes in der Leber blieb in allen Fällen hinter der durch Zufütterung von Cholin erreichten zurück.

Die bereits erwähnte, von Avigan (3), Klenk und Kremer (23) und von Steinberg et al. (33) beobachtete Erhöhung des Leberlipidgehaltes nach oralen Gaben von Phytol wurde ebenfalls unter für die Versuchstiere sehr ungünstigen Begleitumständen gefunden. Phytol war hier bis zu einem Anteil von 5 Kalorienprozent der Nahrung beigemischt worden. In dieser Dosierung zeigt Phytol starke toxische Effekte. Steinberg et al. (33) berichten über eine Verminderung der Nahrungsaufnahme im Vergleich zu Kontrollen bis zur Hälfte; es trat eine starke Wachstumsverzögerung auf, und nur etwa die Hälfte der Ratten überlebte. Eine Fütterung mit einer 0,5 % Phytol enthaltenden Nahrung - das entspricht einer täglichen Menge von 50 bis 100 mg Phytol - zeigte selbst nach 15 Monaten keine toxischen Erscheinungen oder Wachstumsverzögerung. Die Lipidanhäufung in der Rattenleber nach Phytolfütterung könnte nach diesen Autoren analog der bei Patienten mit Refsum-Krankheit gefundenen Fetteinlagerung in der Leber sein.

Auch bei dieser Erkrankung liegen ungewöhnliche Bedingungen vor. Die Patienten sind in der Lage, Phytol in Phytansäure umzuwandeln, der weitere Abbau der Phytansäure ist jedoch gestört, wodurch die Anhäufung dieser Substanz im Organismus zustande kommt. Die Phytansäure

bildet einen hohen Anteil der Fettsäuren in den Organlipiden und Serumlipiden dieser Patienten. Bei den von Klenk und Kahlke (22) untersuchten Patientenorganen bestanden über 50 % der Fettsäuren in den gesamten Leberlipiden aus Phytansäure. Ähnliche Befunde wurden auch von Hansen (19) und Kremer (24) bei anderen Patienten erhoben.

Eine Anhäufung von Phytansäure wird auch in den Leberlipiden der mit Phytol gefütterten Ratten gefunden (Baxter et al. (5), Bernhard et al. (6), Klenk und Kremer (23) und Mize et al. (26)). Diese Anhäufung der Phytansäure wird vor allem bei hoher täglicher Gabe von Phytol beobachtet. Wird die Phytolzufuhr abgebrochen, geschieht die Elimination der gespeicherten Phytansäure aus der Leber sehr schnell (Klenk und Kremer (23) und Steinberg et al. (34)). Der größte Anteil der Phytansäure wird in die Cholesterinester- und Triglyceridfraktionen der Leberlipide eingebaut, der Einbau in die Phospholipide ist gering (Klenk und Kremer (23)). Die gleiche Verteilung der Phytansäure in den Leberlipiden liegt auch bei Patienten mit Refsum-Syndrom vor (Klenk und Kahlke (22) und Kremer (24)).

Phytol wird von Ratten sowohl nach Beimengung zum Futter als auch nach Einzelgaben mit der Schlundsonde ausreichend aus dem Magen-Darm-Kanal resorbiert. Versuche, bei denen radioaktiv markiertes Phytol verfüttert wurde, ergaben bei verschiedenen Autoren unterschiedliche Ergebnisse für den Anteil des resorbierten Phytols. Nach neueren Untersuchungen von Baxter et al. (5) und Mize et al. (26) wird innerhalb von 24 Stunden bei Dosen unter 100 mg im Durchschnitt etwa die Hälfte in den Organismus aufgenommen. Wird die Dosis bis auf 300 bis 500 mg erhöht, so wird nach Baxter et al. (5) der von der zugeführten Gesamtmenge resorbierte Anteil geringer. Untersucher,

die die resorbierte Menge nach dem im Magen-Darm-Trakt verbliebenen Anteil des zugeführten Phytols beurteilen, kommen möglicherweise zu einer niedrigeren Resorptionsquote, weil resorbiertes Phytol zum Teil wieder mit der Galle ausgeschieden wird (Baxter et al. (5)). Es besteht somit ein enterohepatischer Kreislauf des Phytols. Sicher ist, daß auch bei täglicher Gabe von Phytol in Mengen unter 100 mg der davon resorbierte Anteil ausreicht, um eindeutige Wirkungen im Rattenorganismus zu zeigen, wie der von Bernhard und Ritzel (7) nachgewiesene lipotrope Effekt des Phytols beweist.

Da Phytol in höherer, toxischer Dosierung, wie erwähnt, zu einer Erhöhung des Lipidgehaltes in der Rattenleber führt, andererseits in niedriger Dosierung unter den Bedingungen einer Cholinmangelfettleber eine gegenteilige, lipotrope Wirkung zeigt und da sein Umwandlungsprodukt Phytansäure im tierischen und im menschlichen Organismus in verschiedener Menge in die Hauptlipidgruppen der Leber eingebaut wird, erscheinen die Fragen interessant, ob bei normal ernährten Ratten orale Phytolgaben in einer noch nicht ausgeprägt toxischen Menge einen Einfluß auf den Gesamtlipidgehalt der Rattenleber haben und ob unter diesen Bedingungen durch Phytol der Anteil der drei Hauptlipidgruppen in der Leber - Glyceride, Phospholipide und Cholesterin - verändert wird.

Nach Untersuchungen über die Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch Phytol von Bernhard und Wagner (8) führt Phytol zu einer Herabsetzung der Fettsäuresynthese aus Acetat in der Leber. Außerdem kann eine Beschleunigung der Acetatoxydation beobachtet werden, die von diesen Autoren als Ausdruck einer beschleunigten Fettsäure-

oxydation angesehen wird. Diese Erscheinungen können bereits bei Gabe kleiner Mengen von Phytol und bei normaler Ernährung der Ratten beobachtet werden und sollen die Ursache für den lipotropen Effekt des Phytols darstellen.

Gleichartige Veränderungen im Fettstoffwechsel treten beim Diabetes mellitus auf, der neben den Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels durch ausgeprägte Störungen des Fettstoffwechsels gekennzeichnet ist. Ashmore et al. (2), Brady und Gurin (11), Wieland und Neufeldt (39) und Wieland et al. (40) fanden bei alloxandiabetischen Ratten eine Verminderung der Fettsäuresynthese in der Leber. Die Fettsäureoxydation in der Leber ist bei Alloxandibetes ebenfalls beschleunigt, was in der erhöhten Ketokörperproduktion unter der diabetischen Stoffwechsellage zum Ausdruck kommt. Nach Wieland (37, 38) und Söling (32) handelt es sich dabei um eine direkte Folge der von Schnatz und Williams (30) bei Insulinmangel nachgewiesenen vermehrten Mobilisation von Fettsäuren aus dem Depotfett. Lossow et al. (25) konnten jedoch auch unabhängig hiervon eine beschleunigte Oxydation von Octansäure in der Leber bei Alloxandibetes nachweisen.

Da Phytol und Alloxandibetes die Fettsäuresynthese und Oxydation in der Leber in gleichgerichteter Weise verändern, könnte daher entsprechend der lipotropen Wirkung des Phytols ein verminderter Fettgehalt der Leber bei Alloxandibetes erwartet werden. Andererseits ist eine Fettleber eine häufige Begleiterscheinung des menschlichen Diabetes mellitus.

Werden alloxandiabetische Ratten normal ernährt, tritt keine Veränderung im Gesamtlipidgehalt und im Verhältnis der Leberlipide zueinander auf. Hoher Fettgehalt der

Nahrung oder erhöhte Zufuhr der einzelnen Lipidfraktionen führt jedoch im Vergleich zu nichtdiabetischen Tieren zu einem Anstieg des Leberlipidgehaltes und zu einer mengenmäßigen Verschiebung der Lipidfraktionen in der Leber (Beveridge und Johnson (10)).

Cohen (13) konnte bei Verfütterung einer normalen Diät an alloxandibetische Ratten ebenfalls keine signifikante Erhöhung des Leberfettgehaltes finden. Hier führte eine cholinfreie Nahrung mit hohem Fettanteil zu einem Anstieg des Leberfettes, der jedoch hinter dem bei Normaltieren beobachteten zurückblieb.

Die Entstehung einer Fettleber bei Diabetes mellitus ist nach Shapiro (31) sehr wahrscheinlich durch die erhöhte Mobilisation von Fettsäuren aus dem Depotfett bedingt. Der erhöhte Fettsäurespiegel im Blut führt zu einer vermehrten Triglyceridsynthese in der Leber (Feigelson et al. (16)). Corder und Kalkhoff (14) vermuten zusätzlich veränderte Enzymaktivitäten, die bei alloxandibetischen Ratten eine erhöhte Triglyceridsynthese bedingen. Die eigentliche Anhäufung der Triglyceride in der Leber scheint jedoch zumindest zum Teil durch eine verminderte Freigabe der vermehrt in der Leber synthetisierten Triglyceride verursacht zu sein (Heimberg et al. (20)). Zufuhr von Insulin kann diese genannten Veränderungen teilweise rückgängig machen.

Ein Teil der bei Diabetes mellitus vermehrt der Leber zufließenden Fettsäuren wird aber auch nach der Oxydation zu Acetat für die Cholesterinsynthese verwendet, ein anderer Teil kann direkt zur Bildung von Phospholipiden herangezogen werden. Damit ist auch ein Einfluß auf diese beiden Lipidfraktionen gegeben. Es scheint bisher nicht geklärt zu sein, weshalb trotz dieser geschilderten Stoffwechselveränderungen bei Alloxandia-

betes nicht regelmäßig die Entwicklung einer Fettleber beobachtet werden kann.

Über den Einfluß der bei Alloxandibabetes verminderten Fettsäuresynthese und beschleunigten Fettsäureoxydation in der Leber auf den Lipidgehalt und auf die Verteilung der Lipidfraktionen der Leber ist bisher nichts bekannt. Da Phytol in dieser Beziehung eine gleichsinnige Wirkung zeigt und abhängig von den Versuchsbedingungen den Lipidgehalt der Leber entweder zu erhöhen oder zu vermindern vermag, wurde in der vorliegenden Arbeit Phytol zusätzlich an chronisch alloxandibetische Ratten verabreicht und der Gesamtlipidgehalt und der Gehalt der Leber an Glyceriden, Phospholipiden und Cholesterin bestimmt.

C. MATERIAL UND METHODIK

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten eines Sprague-Dawley-Stammes. Entsprechend den Versuchsbedingungen wurden die Tiere in die vier Gruppen

- Gruppe 1 = nichtdiabetische Ratten, keine Phytolgabe,
- Gruppe 2 = nichtdiabetische Ratten, Phytolgabe,
- Gruppe 3 = alloxandiabetische Ratten, keine Phytolgabe,
- Gruppe 4 = alloxandiabetische Ratten, Phytolgabe,

eingeteilt.

Von den nichtdiabetischen Tieren gelangten 2 Tiere, die Phytol erhalten hatten und 1 Tier ohne Phytol ad exitum.

Von den alloxandiabetischen Tieren überlebte etwa ein Drittel nicht die erste Woche, im weiteren Verlauf starben nur noch 3 Tiere, von denen 2 Phytol erhalten hatten. Fünf Tiere konnten nicht verwendet werden, da der Diabetes am Ende der Beobachtung nicht mehr nachzuweisen war.

Alle Tiere wurden mit Altromin Trockenkeks (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum gefüttert.

Die im folgenden genannte Anzahl entspricht stets den zur endgültigen Auswertung verwendeten Tieren.

a) Nichtdiabetische Tiere

Verwendet wurden 26 Ratten mit Gewichten von 105 bis 135 g. 13 der Ratten (Gruppe 2) erhielten über einen Zeitraum von 30 Tagen einmal pro Tag mit der Schlundsonde 80 bis 90 mg Phytol (Fa. Merck, Darmstadt), die anderen erhielten kein Phytol (Gruppe 1).

b) Alloxandiabetische Tiere

Verwendet wurden 17 Ratten mit Gewichten von 135 bis 180 g. 11 Tage nach Erzeugung des Alloxandiabetes erhielten 8 der Ratten (Gruppe 4) über einen Zeitraum von 29 Tagen einmal pro Tag mit der Schlundsonde 80 bis 90 mg Phytol. Die restlichen Tiere (Gruppe 3) erhielten kein Phytol.

Zur Diabeteserzeugung war Alloxan (in zehnprozentiger Lösung mit aqua bidest.) in einer Menge von 200 mg/kg Körpergewicht nach zweitägiger Nahrungskarenz subcutan unter die Nackenhaut injiziert worden.

Die Tiere wurden täglich mit Glukotest-Streifen (Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim) auf Zuckerausscheidung im Urin kontrolliert. Nach Maßgabe des Urinzuckers wurden ab dem dritten Tag nach der Alloxangabe pro Tag und Tier zwischen 1 und 4 E Depot-Insulin "Höchst" subcutan verabreicht. Nur die Tiere wurden als diabetisch betrachtet, die während der gesamten Versuchsdauer eine Glukosurie zeigten.

Der Mittelwert des Plasmaglukosegehaltes aller alloxandiabetischen Tiere betrug bei Versuchsende 367 ± 112 mg %.

Alle Tiere wurden in Äthernarkose laparotomiert und durch Punktion der unteren Hohlvene entblutet. Die Leber wurde vollständig entnommen und sofort gewogen.

2. Gewinnung der Gesamtlipide

Die Leber eines jeden Tieres wurde in einem Chloroform-Methanol-Gemisch im Volumenverhältnis 2 : 1 homogenisiert und nach mehrfachem Umschütteln über Nacht stehen gelassen. Der Extrakt wurde unter dreimaligem Nachspülen über eine Nutsche von dem Leberhomogenat abge-

saugt. Zur Entfernung mitextrahierter wasserlöslicher Bestandteile wurde der Extrakt mit $1/5$ des Volumens 0,04%iger wässriger CaCl_2 -Lösung im Scheidetrichter geschüttelt (nach Folch et al. (18)). Nach Phasentrennung erfolgte Einengung der unteren Phase im Rotationsverdampfer bei 30 bis 40°C Wasserbadtemperatur. Der eingeeengte Extrakt wurde in Äther aufgenommen und über eine Glasfritte G 3 in ein gewogenes Spitzkölbchen filtriert. Nach Abdampfen des Äthers im Rotationsverdampfer bei 30°C und vollständigem Vertreiben des noch verbliebenen Äthers im Stickstoffstrom bei 50°C auf dem Wasserbad ergab sich nach nochmaligem Wiegen die Menge der Gesamtlipide.

3. Bestimmung der einzelnen Lipidfraktionen

Sämtliche Bestimmungen wurden mit einem in Chloroform gelösten aliquoten Teil der extrahierten Leberlipide durchgeführt. Alle Bestimmungen erfolgten doppelt.

a) Glyceridbestimmung (nach Eggstein und Kreutz (15))

Die verwendeten Reagentien entstammten der Biochemica-Test-Combination für Glycerin und Neutralfett der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim.

Prinzip:

Nach alkalischer Verseifung der Triglyceride wird das entstandene Glycerin mittels Glycerokinase zu Glycerophosphat umgewandelt. Das Glycerophosphat wird in einer Hilfsreaktion umgewandelt und in einer nachfolgenden Indikatorreaktion wird im Reaktionsgemisch enthaltenes NADH oxydiert. Die NADH-Abnahme wird photometrisch bestimmt. Die gemessene Extinktionsdifferenz wird zur Be-

rechnung des Triglyceridgehaltes verwendet.

Für die Berechnung muß ein durchschnittliches Molekulargewicht der Triglyceride verwendet werden, welches mit 855 angenommen wurde.

b) Phospholipidbestimmung

Die Bestimmung der Phospholipide erfolgte nach Bartlett (4), wobei nach vollständiger Veraschung des Lipidextraktes der freigesetzte Phosphor mit Hilfe einer Farbreaktion photometrisch (Fiske und Subarrow (17)) bestimmt wird. Die Menge an Phospholipiden ergibt sich nach Multiplikation der gefundenen Phosphormenge mit dem Faktor 25.

c) Cholesterinbestimmung

Es wurde die Methode nach Zak (41) verwendet. Mit dieser Methode wird das Gesamtcholesterin über eine Farbreaktion mit Eisenchlorid photometrisch erfaßt.

4. Analyse des Fettsäuremusters

Ca. 50 mg des Gesamtlipidextraktes wurden mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure umgeestert. Das Gemisch der Fettsäuremethylester wurde gaschromatographisch aufgetrennt. Der relative prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuren am Gesamtgemisch wurde an Hand der Flächenanteile der einzelnen Fettsäuregipfel errechnet.

Die Auftrennung wurde mit einem Gaschromatographen der Fa. Packard Instruments GmbH bei einer Temperatur von 160°C auf einer 180 cm langen, mit 15 % DEGS (Diethylenglycolsuccinate)-Polyester beladenen Säule vorgenommen. Das Gerät ist mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet. Als Trägergas diente Argon.

D. STATISTIK

1. Berechnungen

Ermittelt wurden von den Variablen

- 1 = % Feuchtgewicht Cholesterin
- 2 = % Feuchtgewicht Phospholipide
- 3 = % Feuchtgewicht Triglyceride und
- 4 = % Feuchtgewicht Gesamtlipide

die Mittelwerte $\bar{x}_j$, die Varianzen s_j^2 und die Standardabweichungen s_j nach folgenden Formeln:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}$$

$$s_j^2 = \frac{1}{n_j - 1} \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

$$s_j = \sqrt{s_j^2}$$

Es bedeuten:

n_j = Zahl der Fälle in der j-ten Gruppe

x_{ij} = i-ter Meßwert der j-ten Gruppe und

$j = 1, 2, \dots, k$, k = Zahl der Gruppen.

2. Methoden der statistischen Auswertung

Mit Hilfe der Varianzanalyse kann geprüft werden, ob sich die beobachteten Mittelwerte überzufällig voneinander unterscheiden. Hierzu wird zunächst aus allen Einzelmeßwerten ein Gesamtmittelwert sowie die Streuung um diesen Mittelwert berechnet. Diese Streuung kann in zwei Komponenten zerlegt werden, wobei der eine Anteil der Variabilität innerhalb der Gruppen (Streuung zwischen den Tieren einer Gruppe = $MAQ_{\text{innerhalb}}$) zugeordnet ist, der andere Anteil dem Effekt, der durch die Gruppenunterschiede ($MAQ_{\text{zwischen den Gruppen}}$) bedingt wird. Mit Hilfe der F-Verteilung kann geprüft werden, ob die Varianz zwischen den Gruppen wesentlich größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Überschreitet der Quotient

$$F = \frac{MAQ_{\text{zwischen den Gruppen}}}{MAQ_{\text{innerhalb der Gruppen}}}$$

die nach Freiheitsgraden $\nu_1 = k - 1$ und $\nu_2 = n - k$ tabellierten 1 % bzw. 5 % Schranken der F-Verteilung, ist der Unterschied zwischen den Gruppen statistisch signifikant bzw. auffällig (n = Zahl der Fälle insgesamt). Damit wird lediglich die Nullhypothese

$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$ abgelehnt, die Gruppenunterschiede müssen jedoch noch näher lokalisiert werden.

Die Lokalisation der mit dem F-Test pauschal nachgewiesenen Unterschiede kann mit der Methode der linearen Kontraste nach Scheffé erfolgen. Mit diesem Verfahren werden zwei Mittelwerte wie folgt verglichen: ist $|\bar{x}_i - \bar{x}_j| > S\alpha$, so ist der Unterschied mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α nachgewiesen. $S\alpha$ ergibt sich aus

$$S\alpha = \sqrt{MAQ_{\text{zwischen}} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right) (k - 1) F(\alpha, \nu_1, \nu_2)}.$$

E. VERSUCHSERGEBNISSE

1. Beobachtungen an den Versuchstieren

Zu Versuchsende bestanden deutliche Unterschiede zwischen der Gewichtszunahme bei den nichtdiabetischen und den diabetischen Ratten (Tabelle 1).

Tabelle 1

Gewichte der Versuchstiere in Gramm und Mittelwerte $\bar{x}$

Gruppe	Nr.	Anfangs- gewicht	End- gewicht	Gruppe	Nr.	Anfangs- gewicht	End- gewicht
1	1	115	295	2	1	125	300
	2	110	280		2	110	300
	3	120	250		3	130	310
	4	115	280		4	120	280
	5	115	270		5	135	295
	6	125	260		6	115	265
	7	105	270		7	130	305
	8	115	280		8	135	260
	9	130	290		9	110	230
	10	120	255		10	130	280
	11	120	280		11	120	230
	12	120	295		12	115	250
	13	115	240		13	115	245
$\bar{x}$		117	273	$\bar{x}$		115	273
=====							
3	1	175	295	4	1	150	210
	2	160	230		2	140	225
	3	140	190		3	150	240
	4	150	190		4	165	285
	5	155	225		5	135	210
	6	140	210		6	140	270
	7	140	220		7	165	270
	8	135	230		8	150	190
	9	180	220				
$\bar{x}$		153	223	$\bar{x}$		149	237

Die Gewichtszunahme der diabetischen Ratten betrug im Mittel nur etwa die Hälfte der bei den nichtdiabetischen Tieren beobachteten Gewichtszunahme. Jedoch konnte weder bei den Tieren mit Diabetes noch bei den Tieren ohne Diabetes ein Einfluß des Phytols auf das Wachstum im Sinne einer Wachstumsverzögerung beobachtet werden. Toxische Effekte des Phytols traten ebenfalls nicht auf. Von allen mit Phytol behandelten Tieren starben nach den anfänglich durch den Alloxandibetes bedingten Todesfällen vier Tiere, von den nicht mit Phytol behandelten Ratten starben insgesamt zwei Tiere. Ein ursächlicher Zusammenhang mit der Phytolgabe erscheint jedoch sehr zweifelhaft, da auch von den gänzlich unbehandelten Tieren eines starb und bei allen überlebenden Tieren keine Beeinträchtigung durch Phytol beobachtet wurde.

2. Einzelergebnisse der Untersuchungen

Tabelle 2 und 3 zeigen für die einzelnen Lipidfraktionen und die Gesamtlipide den Anteil in Prozent des Feuchtgewichtes der Leber.

Für die Lipidfraktionen wird zusätzlich der Anteil in Prozent der Gesamtlipide angegeben. Beide Werte stehen auf Grund des Rechenvorganges zueinander in Beziehung.

Tabelle 2
Lipidgehalte der Leber bei den Normaltieren

Gruppe	Nr.	Cholesterin %	Gesamt- lipide	Feucht- gewicht	Phospholipide %	Gesamt- lipide	Feucht- gewicht	Triglyceride %	Gesamt- lipide	Feucht- gewicht	Gesamtlipide %	Feuchtgewicht
1	1	7,95	0,55	56,35	3,26	19,07	1,10	4,91				
	2	9,37	0,55	69,02	3,36	17,83	0,87	4,78				
	3	9,11	0,50	71,28	3,28	16,53	0,76	4,54				
	4	8,53	0,56	56,23	3,09	16,38	0,90	4,55				
	5	9,43	0,50	69,61	3,06	15,05	0,66	4,22				
	6	10,77	0,53	69,61	2,88	10,01	0,41	3,82				
	7	9,69	0,51	76,03	3,34	12,72	0,56	4,41				
	8	10,35	0,59	71,21	3,37	13,38	0,63	4,59				
	9	8,16	0,53	56,57	3,08	26,44	1,44	5,05				
	10	8,66	0,46	53,76	2,40	25,35	1,13	3,99				
	11	8,83	0,51	63,56	3,10	19,68	0,96	4,57				
	12	9,27	0,55	61,41	3,03	17,86	0,88	4,46				
	13	8,94	0,48	67,50	3,01	12,16	0,54	4,03				
2	1	8,76	0,53	64,92	3,28	18,33	0,93	4,74				
	2	8,54	0,47	61,29	2,85	19,36	0,90	4,22				
	3	9,01	0,52	58,20	2,80	23,50	1,13	4,45				
	4	8,64	0,44	64,28	2,73	16,68	0,71	3,88				
	5	9,88	0,54	67,23	3,06	17,71	0,81	4,41				
	6	8,65	0,51	58,40	2,89	19,12	0,95	4,35				
	7	8,56	0,51	60,69	3,03	19,90	0,99	4,53				
	8	10,26	0,57	62,40	2,90	20,10	0,93	4,40				
	9	8,87	0,49	64,38	2,99	16,95	0,79	4,27				
	10	9,51	0,48	65,54	2,76	17,55	0,74	3,98				
	11	10,10	0,64	61,76	3,27	16,85	0,89	4,80				
	12	9,63	0,50	69,57	2,99	15,71	0,68	4,17				
	13	8,41	0,46	68,35	3,13	15,94	0,73	4,32				
Variable:		1			2		3		4			

Tabelle 3
Lipidgehalte der Leber bei den alloxandiabetischen Tieren

Gruppe	Nr.	Cholesterin % Gesamt- lipide	Feucht- Gewicht	Phospholipide % Gesamt- lipide	Feucht- Gewicht	Triglyceride % Gesamt- lipide	Feucht- Gewicht	Gesamtlipide % Feuchtgewicht
3	1	10,20	0,46	64,80	2,42	16,81	0,75	3,63
	2	9,62	0,56	62,40	3,02	16,12	0,94	4,52
	3	11,07	0,53	74,20	2,94	13,65	0,54	4,01
	4	9,77	0,61	63,97	3,32	19,73	1,04	4,97
	5	9,58	0,51	69,60	3,07	12,29	0,54	4,12
	6	10,69	0,47	60,60	2,28	27,02	1,01	3,76
	7	8,81	0,51	62,50	3,00	20,05	0,98	4,49
	8	9,18	0,44	64,60	2,60	16,88	0,68	3,72
	9	9,11	0,34	58,30	1,85	20,69	0,78	2,97
4	1	10,26	0,58	60,40	2,87	20,50	0,98	4,43
	2	9,80	0,58	68,55	3,39	17,01	0,84	4,81
	3	9,53	0,52	60,30	2,75	19,10	0,87	4,14
	4	8,93	0,58	59,82	3,23	25,17	1,36	5,17
	5	9,75	0,68	58,74	3,41	30,22	1,76	5,85
	6	9,95	0,75	64,95	4,06	18,11	1,14	5,90
	7	7,49	0,42	55,40	2,55	20,15	0,93	3,90
	8	9,03	0,45	64,50	2,70	14,30	0,72	3,87
Variable:		1		2		3		4

3. Beschreibung und statistische Auswertung der gefundenen Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung wurden die in Prozent des Feuchtgewichtes angegebenen Werte verwendet. Die Ergebnisse der Berechnungen für die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in den Abbildungen 1 bis 4 dargestellt, die errechneten Werte einschließlich der Varianzen finden sich in den Tabellen 4 bis 7. Die Tabellen 8 bis 11 zeigen die Ergebnisse der Varianzanalysen. Die Abbildungen und Tabellen sind diesem Kapitel angefügt.

Der Vergleich der Mittelwerte für den Anteil des Cholesterins am Feuchtgewicht der Leber (Tab. 4 und Abb. 1) ergibt mit 0,52 % und 0,51 % nahezu gleiche Werte bei den nichtdiabetischen Tieren. Bei den diabetischen Tieren liegt der Wert für die mit Phytol behandelten Tiere mit 0,57 % über dem der Vergleichsgruppe mit 0,49 %. Die durchgeführte Varianzanalyse (Tab. 8) zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Bei den Phospholipiden (Tab. 5 und Abb. 2) findet sich die größte Differenz der Mittelwerte ebenfalls bei den diabetischen Tieren. Die Leber der Tiere, die Phytol erhielten, enthält 3,12 %, die der Vergleichsgruppe 2,72 % Phospholipide. Die Mittelwerte der nichtdiabetischen Tiere liegen mit 3,10 % ohne Phytol und 2,98 % mit Phytol näher an dem für die mit Phytol behandelten diabetischen Tiere gefundenen Wert. Auch hier ergibt die Varianzanalyse keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 9).

Im Bereich der Lipidfraktionen zeigen die Mittelwerte der Triglyceride (Tab. 6 und Abb. 3), gemessen an der absoluten Größe der Werte, die größten Differenzen. Auch hier findet sich wie bei Cholesterin und Phospholipiden der höchste Wert von 1,08 % bei den diabetischen Tieren, die Phytol erhielten. Ebenso findet sich der niedrigste Wert bei der diabetischen Vergleichsgruppe mit 0,81 %. Zwischen diesen beiden Gruppen liegen die Mittelwerte der nichtdiabetischen Tiere mit 0,86 % für die Tiere mit Phytol und 0,83 % für die Vergleichsgruppe. Jedoch ergeben sich in der Varianzanalyse auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 10).

Beim Vergleich der Mittelwerte für den Anteil der Gesamtlipide am Feuchtgewicht der Leber (Tab. 7 und Abb. 4) ergeben sich prinzipiell die gleichen Verhältnisse. Der größte Unterschied der Mittelwerte findet sich wiederum bei den diabetischen Tieren und der höchste Wert von 4,76 % ist den Tieren, die Phytol erhielten, zugeordnet. In der Vergleichsgruppe beträgt der Gesamtlipidgehalt nur 4,02 %. Bei den nichtdiabetischen Tieren liegen die Mittelwerte zwischen denen bei Diabetes und unterscheiden sich mit 4,35 % für die Tiere mit Phytol und 4,46 % für die Vergleichsgruppe nicht stark voneinander.

In der Varianzanalyse war der Unterschied der Mittelwerte für die Gesamtlipide statistisch auffällig (Tab. 11). Mit der Methode der linearen Kontraste nach Scheffé ließ sich hier ein auffälliger Unterschied ($P < 0,05$) nur für die Mittelwerte der diabetischen Tiere nachweisen. Die Tiere, die Phytol erhalten hatten, wiesen den höheren Gesamtlipidgehalt der Leber auf. Alle übrigen linearen Kontraste waren nicht signifikant.

4. Ergebnisse der Gaschromatographie

Bei den Ergebnissen der Gaschromatographie interessiert im vorliegenden Zusammenhang nur der relative Gehalt des Fettsäuregemisches an Phytansäure.

Da schon normalerweise geringe Mengen von Phytansäure in der Rattenleber vorhanden sind, kam es darauf an, einen Unterschied in der Höhe des Gehaltes der Leber an Phytansäure zwischen den Tiergruppen mit und ohne Phytolfütterung nachzuweisen.

Weder die normalen, noch die alloxandiabetischen Ratten zeigten mit und ohne Phytolfütterung in den Chromatogrammen Unterschiede der Flächeninhalte im Bereich der Phytansäurelokalisierung.

% Feuchtwicht

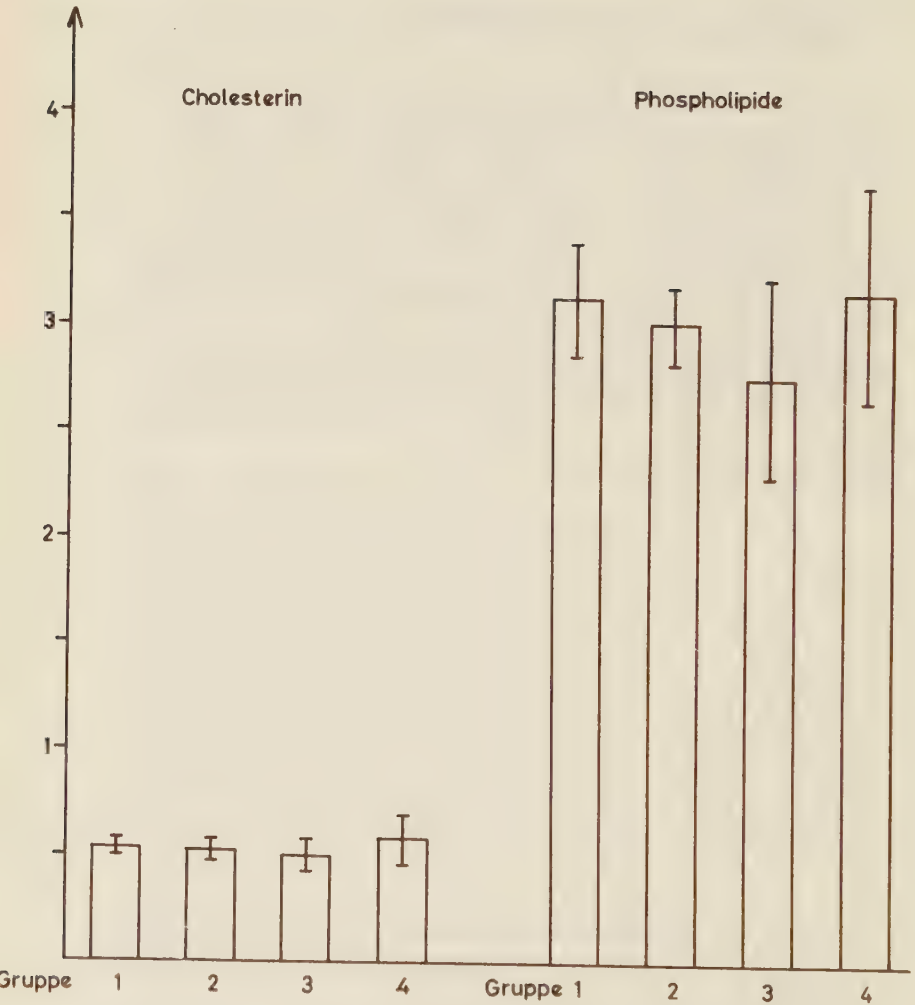
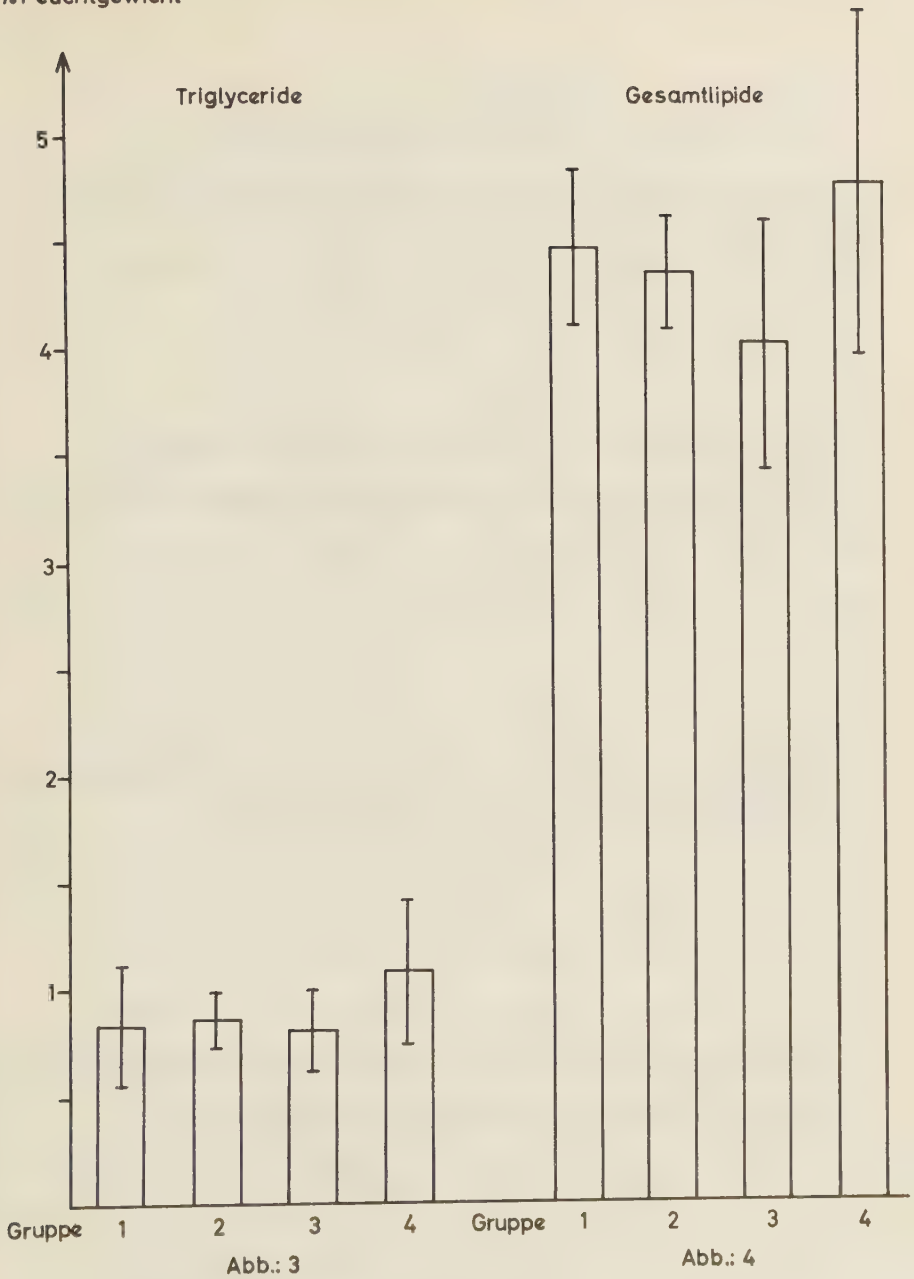


Abb.: 1

Abb.: 2

Mittelwerte und Standardabweichungen für den Gehalt
der Leber an Cholesterin und Phospholipiden

%Feuchtgewicht



Mittelwerte und Standardabweichungen für den Gehalt
der Leber an Triglyceriden und Gesamtlipiden

Tabelle 4

für Variable 1 = % Feuchtgewicht Cholesterin

Gruppe Mittelwert Varianz Standardabweichung

1	0,52	0,0013	0,036
2	0,51	0,0027	0,052
3	0,49	0,0060	0,077
4	0,57	0,0120	0,110

Tabelle 5

für Variable 2 = % Feuchtgewicht Phospholipide

Gruppe Mittelwert Varianz Standardabweichung

1	3,10	0,0675	0,260
2	2,98	0,0317	0,178
3	2,72	0,2193	0,468
4	3,12	0,2505	0,500

Tabelle 6

für Variable 3 = % Feuchtgewicht Triglyceride

Gruppe Mittelwert Varianz Standardabweichung

1	0,83	0,0807	0,284
2	0,86	0,0170	0,130
3	0,81	0,0382	0,196
4	1,08	0,1154	0,340

Tabelle 7

für Variable 4 = % Feuchtgewicht Gesamtlipide

Gruppe Mittelwert Varianz Standardabweichung

1	4,46	0,1310	0,362
2	4,35	0,0681	0,261
3	4,02	0,3495	0,591
4	4,76	0,6690	0,818

Varianzanalysetabellen

Tabelle 8: Varianzanalyse für Cholesterin

Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	Signifikanz
zwischen d. Gruppen	$2,77 \times 10^{-3}$	3	$9,24 \times 10^{-4}$	2,00	nicht signifikant
innerhalb	$17,97 \times 10^{-3}$	39	$4,61 \times 10^{-4}$		
Total	$20,74 \times 10^{-3}$	42			

Tabelle 9: Varianzanalyse für Phospholipide

Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	Signifikanz
zwischen d. Gruppen	$9,31 \times 10^{-2}$	3	$3,10 \times 10^{-2}$	2,58	nicht signifikant
innerhalb	$46,97 \times 10^{-2}$	39	$1,20 \times 10^{-2}$		
Total	$56,28 \times 10^{-2}$	42			

Tabelle 10: Varianzanalyse für Triglyceride

Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	Signifikanz
zwischen d. Gruppen	$3,85 \times 10^{-2}$	3	$12,85 \times 10^{-3}$	2,19	nicht signifikant
innerhalb	$22,86 \times 10^{-2}$	39	$5,86 \times 10^{-3}$		
Total	$26,71 \times 10^{-2}$	42			

Tabelle 11: Varianzanalyse für Gesamtlipide

Streuungsursache	SAQ	FG	MAQ	F	Signifikanz
zwischen d. Gruppen	$2,39 \times 10^{-1}$	3	$7,97 \times 10^{-2}$	3,15	$P < 0,05$
innerhalb	$9,87 \times 10^{-1}$	39	$2,53 \times 10^{-2}$		
Total	$12,26 \times 10^{-1}$	42			

FG = Freiheitsgrade

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

MAQ = Mittleres Abweichungsquadrat

F. DISKUSSION

Die gefundenen Ergebnisse sollen für die beiden unterschiedlichen Tierkollektive - nichtdiabetische und diabetische Ratten - zunächst getrennt diskutiert werden.

Bei den nichtdiabetischen Tieren konnte kein meßbarer Einfluß des Phytols festgestellt werden, da sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Gesamtlipidgehalt und im Gehalt der Lipidgruppen in der Leber gegenüber dem der normalen Vergleichstiere fand. Dies steht im Gegensatz zu der von anderen Autoren bei höherer Phytoldosis gefundenen Lipiderhöhung in der Rattenleber. Bei einer ähnlich hohen Dosierung von Phytol bei Ratten wie in der vorliegenden Arbeit konnten allerdings Steinberg et al. (33) mikroskopisch eine mäßige, aber deutliche Fettanhäufung in den Zellen der gesamten Leber nachweisen. Außerdem fanden sich vereinzelt Fetttropfen in den proximalen Tubuluszellen der Niere. Diese beiden Befunde konnten bei Vergleichstieren nicht erhoben werden. Offenbar hatte eine, wenn auch mäßige Lipidansammlung in diesen beiden Organen stattgefunden. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings keine mikroskopischen Untersuchungen durchgeführt.

Das dem Organismus zugeführte Phytol wird zunächst zur Phytansäure oxydiert. Wegen der besonderen chemischen Konstitution der Phytansäure ist deren weiterer Abbau jedoch nur in beschränktem Umfange möglich. Die notwendige α -Oxydation stellt einen Engpaß im Stoffwechsel dar. Größere Mengen von Phytol und damit von Phytansäure führen daher zwangsläufig zu einer Anhäufung dieser Säure im Organismus, was von mehreren Autoren nachgewiesen wurde (23, 33, 34). Die gleichzeitig bei hoher

Dosierung von Phytol zu beobachtende Fettansammlung in der Leber könnte, wofür auch der hohe Anteil von Phytansäure an den Fettsäuren der Lipide spricht, ihre Ursache in der wegen der begrenzten Abbaukapazität retinierten Phytansäure haben. Diese nicht metabolisierbare Phytansäure kann in größerer Menge nur als Baustein von Lipiden im Organismus verbleiben. Die Folge davon ist eine Anhäufung dieser Lipide. Offenbar wurden bei der in der vorliegenden Arbeit angebotenen Phytolmenge von 80 bis 90 mg täglich die Grenzen der Abbaukapazität für Phytansäure noch nicht in dem Maße erreicht, daß es zu einer chemisch meßbaren Speicherung phytansäurehaltiger Lipide kam. Außerdem war diese Phytolmenge stoffwechselgesunden, normal ernährten Ratten verabreicht worden. Wegen der niedrigen Phytoldosierung konnten wohl auch die sonst zu beobachtenden toxischen Effekte des Phytols bzw. der Phytansäure nicht festgestellt werden.

Die obengenannte Erklärung der durch Phytansäure bedingten Lipidanhäufung in der Leber könnte ebenfalls für die bei Patienten mit Refsum-Krankheit zum Teil gefundene Fettleber gelten. Allerdings ist bei diesen Patienten die Anhäufung der Phytansäure im Organismus nicht durch eine übermäßige Zufuhr bei begrenzter Abbaufähigkeit, sondern durch einen genetisch bedingten Defekt im α -Oxydationsmechanismus verursacht (Herndorn et al. (21)).

Bei den diabetischen Tieren zeigte sich ein statistisch auffälliger Unterschied im Gesamtlipidgehalt der Leber, wobei die mit Phytol behandelten Ratten einen höheren Gesamtlipidgehalt der Leber gegenüber den Vergleichstieren aufwiesen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist nur gering und offenbar durch eine Summation der bei allen drei Lipidfraktionen beobachteten, gleich-

sinnig aufgetretenen, jedoch statistisch nicht als signifikant nachweisbaren Vermehrungen bedingt. Eine Interpretation dieses Ergebnisses auf der für die nichtdiabetischen Tiere bereits angewandten Grundlage scheint auch hier möglich.

Die Summierung der im einzelnen nicht signifikanten Unterschiede im Gehalt der Lipidgruppen zu dem auffälligen Unterschied im Gesamtlipidgehalt der Leber könnte auf eine bei den Lipidgruppen noch nicht faßbare, bei den Gesamtlipiden jedoch in Erscheinung tretende Anhäufung von Lipiden in der Leber der mit Phytol behandelten diabetischen Ratten hinweisen. Es ist denkbar, daß die Kapazität zum Abbau von Phytansäure im diabetischen Zustand im Vergleich zu Normaltieren reduziert ist, da der Fettsäurestoffwechsel in der Leber diabetischer Ratten durch die erhöhte Lipolyse mit vermehrtem Zustrom von freien Fettsäuren zur Leber ohnehin stark belastet ist.

Diese Auffassung kann aber auf Grund der durchgeführten Untersuchung des Fettsäuremusters der Leberlipide nicht bestätigt werden, da kein Unterschied im Phytansäuregehalt der Leber zwischen den diabetischen Tieren mit und ohne Phytol gefunden wurde. Offenbar werden bei alloxandiabetischen Ratten unter der Einwirkung von Phytol alle Fettsäuren ihrem normalen Muster entsprechend etwa gleichmäßig an der geringen Lipidanhäufung beteiligt.

Die bei Alloxandiabetes vermehrte Triglyceridsynthese in der Leber und die verminderte Freigabe dieser Triglyceride aus der Leber hätte allerdings auch ohne Phytolgabe eine Erhöhung zumindest des Triglyceridgehaltes der Leber erwarten lassen. Es zeigt sich jedoch beim Vergleich der entsprechenden Werte für die diabetischen und nichtdiabetischen Tiere, daß es nicht

zur Entwicklung einer diabetischen Fettleber kam. Damit werden die Ergebnisse anderer Autoren (10, 13) bestätigt. Offenbar entwickelt sich ein Lipidanstieg in der Leber alloxandiabetischer Ratten nur bei zusätzlicher Belastung des Fettstoffwechsels, zum Beispiel durch erhöhten Lipidgehalt der Nahrung (Beveridge und Johnson (10)) oder durch Cholinmangelernährung bei hoher Fettzufuhr (Cohen (13)).

Eine ähnliche, wenn auch bedeutend geringere Wirkung müßte daher auch dem Phytol zugesprochen werden, welches die Abbaukapazität der Leber für Fettsäuren zusätzlich beansprucht.

In diesem Zusammenhang müssen auch für die Entwicklung der Fettleber beim Diabetes mellitus des Menschen zusätzliche Faktoren angenommen werden, die in der relativ zu hohen alimentären Aufnahme von Lipiden liegen müssen.

Im Widerspruch zu der durch Phytolfütterung induzierbaren Lipiderhöhung in der Rattenleber und dem dafür diskutierten Entstehungsmechanismus scheint der von Bernhard und Ritzel (7) gefundene lipotrope Effekt und dessen Erklärung durch eine phytolbedingte verminderte Fettsäuresynthese und beschleunigte Fettsäureoxydation zu stehen. Da jedoch beim Diabetes mellitus trotz dieser gleichen Fettstoffwechselveränderungen eine Fettleber auftreten kann, muß angenommen werden, daß der Lipidgehalt der Leber auch unter anderen Bedingungen nicht allein die Folge des jeweiligen Ausmaßes der Fettsäuresynthese und Fettsäureoxydation darstellt. Eine weit größere Bedeutung dürfte der für den Stoffwechsel in der Leber zur Verfügung stehenden Gesamtmenge an Fettsäuren und den mit diesen reagierenden Substraten zukommen. Zu denken ist hierbei im Falle der Triglyceride an α -Glycerophosphat und im Falle

der Phospholipide an deren Bausteine. Auch die jeweils vorhandenen Enzymaktivitäten sind von Bedeutung.

Der Lipidgehalt der Leber und die Verteilung der Lipidfraktionen wird letztlich abhängig von den Versuchsbedingungen und dem Zeitpunkt der Untersuchung durch die Summe aller auf den Fettstoffwechsel einwirkenden Einflüsse bestimmt. Durch die Zu- oder Abnahme eines oder mehrerer dieser Einflüsse wird der Lipidgehalt, unter Umständen nur vorübergehend, zu einem neuen Gleichgewichtszustand verschoben. So kann zum Beispiel durch Insulin, dessen akuter Mangel eine Fettleber verursacht, auf Grund seiner die Fettsäuresynthese steigern und die Fettsäureoxydation hemmenden Wirkung eine vorübergehende starke Lipiderhöhung in der Leber alloxandiabetischer Ratten erzielt werden (Osborn et al. (27)). Im Einzelfall wird es nicht immer möglich sein, das Ausmaß der in die verschiedenen, zum Teil entgegengesetzten Richtungen wirkenden Kräfte zu bestimmen.

Besteht ein Einfluß auf den Fettstoffwechsel der Leber über einen längeren Zeitraum in konstanter Größe, so repräsentiert der Lipidgehalt der Leber den dann bestehenden Gleichgewichtszustand. Diese Bedingungen sind bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Phytol gegeben. Sie treffen auch für die bereits geschilderten Untersuchungen anderer Autoren zu.

Ausgehend von den Eigenschaften des Phytols werden für den Lipidgehalt der Leber unter den verschiedenen Versuchsbedingungen folgende Erklärungen angenommen:

1. Im Falle starker Lipiderhöhung in der Leber durch Cholinmangelernährung führt die phytolbedingte verminderte Fettsäuresynthese und erhöhte Fettsäureoxydation zu einem Abfall des Lipidgehaltes. Phytol ersetzt hier möglicherweise eine Teilfunktion des Cholins, welches selbst einen beschleunigenden Effekt auf die Fettsäureoxydation zu haben scheint (Artom (1)). Im Ergebnis werden weniger Fettsäuren für den Aufbau von zusammengesetzten Lipiden in der Leber zur Verfügung gestellt.

2. Wird Phytol in großer Menge dem Organismus zugeführt, erhöht es die insgesamt zur Verfügung stehende Menge an Fettsäuren, die in Lipide der Leber eingebaut werden können. Phytansäure wird in unphysiologisch großer Menge im Organismus angehäuft. Da die Abbaukapazität für Phytansäure nicht wirksam gesteigert werden kann, kommt es zur Anhäufung phytansäurehaltiger Lipide in der Leber. Der Einfluß des Phytols auf Fettsäuresynthese und Oxydation kann nicht ausreichend wirksam werden, da der Hauptanteil der Fettsäuren durch Phytansäure selbst gebildet wird.

3. Mäßige Mengen von Phytol können noch ausreichend aus dem Organismus eliminiert werden. Es kommt zu keiner Lipiderhöhung in der Leber. Hier läßt sich schwer beurteilen, ob die Fettsäuresynthese und Oxydation wesentlich beeinflußt werden.

4. Bei Alloxandiabetes vermag die durch Phytol mögliche Beschleunigung der Fettsäureoxydation und Verminderung der Fettsäuresynthese keine Wirkung zu entfalten, da die gleichen Stoffwechseleränderungen bereits durch den Diabetes selbst bestehen. Es ist unwahrscheinlich, daß eine weitere Steigerung dieser Vorgänge durch Phytol möglich ist. Weit stärker spielt hier das hohe

Fettsäureangebot für die Leber eine Rolle, welches seine Ursache in der erhöhten Fettsäuremobilisation in der Peripherie hat. Dieses Angebot wird durch Phytol und die daraus entstehende Phytansäure weiter verstärkt, so daß eine, wenn auch nur geringe Erhöhung des Leberlipidgehaltes resultiert. Hierbei könnte man annehmen, daß vermehrt phytansäurehaltige Lipide gespeichert werden.

Auf Grund der durchgeführten Analyse des Fettsäuremusters läßt sich allerdings nicht beweisen, daß ausschließlich phytansäurehaltige Lipide vermehrt abgelagert werden.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist keine Veränderung im Verhältnis der Hauptlipidgruppen in der Leber zueinander zu erkennen. Ursache hierfür dürfte die insgesamt nur geringe Erhöhung des Lipidgehaltes in der Leber der alloxandiabetischen Ratten sein.

G. ZUSAMMENFASSUNG

1. An 13 gesunden und 8 alloxandiabetischen männlichen Albinoratten wurde der Einfluß von oralen täglichen Gaben von 80 bis 90 mg Phytol auf die Leberlipide untersucht. Als Vergleichstiere dienten 13 gesunde und 9 alloxandiabetische Ratten.
2. Von jedem Versuchstier wurden der Gesamtlipidgehalt der Leber und der Gehalt der Leber an Cholesterin, Phospholipiden und Triglyceriden bestimmt und eine gaschromatographische Analyse des Fettsäuremusters der Leber vorgenommen.
3. Bei den gesunden Ratten zeigten die Untersuchungen keine statistisch signifikanten Unterschiede.
4. Bei den alloxandiabetischen Ratten ergab sich ein statistisch auffälliger Unterschied im mittleren Gesamtlipidgehalt der Lebern, wobei die Tiere, die Phytol erhalten hatten, einen höheren Gesamtlipidgehalt aufwiesen. Demgegenüber ließ sich bei den Lipidfraktionen kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen.
5. Gaschromatographisch bestanden zwischen den vier Tiergruppen keine Unterschiede der Flächeninhalte im Bereich der Phytansäurelokalisation.
6. Als Erklärung für dieses Verhalten wird angenommen, daß gesunde Ratten eine tägliche Phytolmenge unter 100 mg noch ausreichend metabolisieren können, während es bei alloxandiabetischen Ratten unter diesen Bedingungen aufgrund der bestehenden Fettstoffwechselstörung zu einer geringen Speicherung von Lipiden in der Leber kommt.
7. Die Entstehung einer Fettleber bei Alloxandiabetes konnte nicht beobachtet werden.

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. Artom, C.: Role of cholin in the hepatic oxidation of fat. Amer. J. clin. Nutr. 6 (1958) 221 - 234
2. Ashmore, James, A. B. Hastings, F. B. Nesbett and A. E. Renold: Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose - 6 - phosphatase. J. biol. Chem. 218 (1956) 77 - 88
3. Avigan, Joel, in: Steinberg, Daniel: Refsum's Disease - A Recently Characterized Lipidosis Involving the Nervous System. Combined Clinical Staff Conference at the National Institutes of Health. Ann. intern. Med. 66 (1967) 383 - 384
4. Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. biol. Chem. 234 (1959) 466 - 468
5. Baxter, James H., Daniel Steinberg, Charles E. Mize and Joel Avigan: Absorption and metabolism of uniformly ¹⁴C-labeled phytol and phytanic acid by the intestine of the rat studied with thoracic duct cannulation. Biochim. biophys. Acta 137 (1967) 277 - 290
6. Bernhard, Karl, René Maier und Günther Ritzel: Beeinflussung der Leberlipide durch Phytol. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348 (1967) 759 - 764
7. Bernhard, Karl und Günther Ritzel: Beiträge zur Pathologie des Fettstoffwechsels. Phytol, ein neuer lipotroper Faktor der Nahrung. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 295 (1953) 187 - 197
8. Bernhard, Karl und Heribert Wagner: Beeinflussung des Leber-Fettstoffwechsels durch Phytol. Helv. chim. Acta 37 (1954) 2356 - 2360
9. Best, C. H. and M. Elinor Huntsman: The effect of choline on the liver fat of rats in various states of nutrition. J. Physiol. (Lond.) 83 (1935) 255 - 274
10. Beveridge, J. M. R. and Shirley E. Johnson: Studies on Diabetic Rats: The Effect of Diabetes and of Diet upon the Plasma and Liver Lipids of Rats. Brit. J. exp. Path. 31 (1950) 294 - 305

11. Brady, R. O. and S. Gurin: Biosynthesis of Labeled Fatty Acids and Cholesterol in Experimental Diabetes. *J. biol. Chem.* 187 (1950) 589 - 596
12. Cammermeyer, Jan: Neuropathological changes in hereditary neuropathies: manifestation of the syndrome hereditary ataxia polyneuritic in the presence of interstitial hypertrophic polyneuropathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 15 (1956) 340 - 361
13. Cohen, A. M.: Relationship between choline-deficient fatty liver and chronic alloxan diabetes in rats. *Amer. J. Physiol.* 198 (1960) 637 - 639
14. Corder, C. N. and R. K. Kalkhoff: Hepatic lipid synthesis in alloxan diabetic rats. *J. Lab. clin. Med.* 72 (1968) 866 - 867
15. Eggstein, M. und F. H. Kreutz: Eine neue Bestimmung des Neutralfetts im Blutserum und Gewebe. *Klin. Wschr.* 44 (1966) 262 - 267
16. Feigelson, E.B., W. W. Pfaff, A. Karmen and D. Steinberg: The role of plasma free fatty acids in development of fatty liver. *J. clin. Invest.* 40 (1961) 2171 - 2179
17. Fiske, Cyrus, H., and Yellapragada Subbarow: The colorimetric determination of phosphorus. *J. biol. Chem.* 66 (1925) 375 - 400
18. Folch, Jordi, M. Lees and G. H. Sloane-Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. biol. Chem.* 226 (1957) 497 - 509
19. Hansen, R. P.: 3,7,11,15 - tetramethylhexadecanoic acid: its occurrence in the tissues of humans afflicted with Refsum's syndrome. *Biochim. biophys. Acta* 106 (1965) 304 - 310
20. Heimberg, M., A. Dunkerley and T. O. Brown: The effect of insulin and alloxan diabetes on hepatic transport of triglycerides and fatty acids. *Biochem. Pharmacol.* 14 (1965) 890 - 893
21. Herndorn, James H. Jr., Daniel Steinberg, B. William Uhlendorf and Henry M. Fales: Refsum's Disease: Characterization of the Enzyme Defect in Cell Culture. *J. clin. Invest.* 48 (1969) 1017 - 1032

22. Klenk, E., und W. Kahlke: Über das Vorkommen der 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (Phytansäure) in den Cholesterinestern und anderen Lipoidfraktionen der Organe bei einem Krankheitsfall unbekannter Genese (Verdacht auf Heredopathia atactica polyneuritiformis (REFSUM-Syndrom)). Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 333 (1963) 133 - 139
23. Klenk, E. und G. J. Kremer: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Phytols, Dihydrophytols und der Phytansäure. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 343 (1965) 39 - 51
24. Kremer, G. J.: Organlipoiduntersuchungen bei einem Kind mit Refsum-Syndrom. Klin. Wschr. 44 (1966) 1089 - 1092
25. Lossow, W. J., G. W. Brown Jr. and I. L. Chaikoff: The action of insulin in sparing fatty acid oxidation: a study with palmitic acid -1-C¹⁴ and octanoate - 1 - C¹⁴. J. biol. Chem. 220 (1956) 839 - 849
26. Mize, Charles E., Joel Avigan, James H. Baxter, Henry M. Fales and Daniel Steinberg: Metabolism of phytol - U -¹⁴C and phytanic acid - U -¹⁴C in the rat. J. Lipid Res. 7 (1966) 692 - 697
27. Osborn, M. J., J. M. Felts and I. L. Chaikoff: Transitory increase in fat content and size of liver induced by insulin in alloxan - diabetic rats. J. biol. Chem. 203 (1953) 173 - 181
28. Reese, Hans and John Bareta: Heredopathia Atactica Polyneuritiformis. J. Neuropath. exp. Neurol. 9 (1950) 385 - 395
29. Richterich, R., H. Moser and E. Rossi: Refsum's Disease (Heredopathia atactica polyneuritiformis) An Inborn Error of Lipid Metabolism with Storage of 3,7,11,15 Tetramethyl Hexadecanoic Acid. A Review of the Clinical Findings. Hum. Genet. 1 (1965) 322 - 332
30. Schnatz, I. D., R. H. Williams: The effect of acute insulin deficiency in rat in adipose tissue lipolytic activity and plasma lipids. Diabetes 12 (1963) 174 - 178

31. Shapiro, B.: Biochemistry of Triglycerides. In:
Lipids and Lipidoses, hrsg. von G. Schettler,
Berlin 1967, S. 52 - 53
32. Söling, H. D.: Zur Autonomie des Ketonkörperstoff-
wechsels. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 72
(1966) 792 - 796
33. Steinberg, Daniel, J. Avigan, C. E. Mize, J. H.
Baxter, J. Cammermeyer, H. M. Fales and
P. F. Highet: Effects of dietary phytol and
phytanic acid in animals. J. Lipid Res. 7
(1966) 684 - 691
34. Steinberg, D., J. Avigan, C. Mize and J. Baxter:
Phytanic acid formation and accumulation in
phytol - fed rats. Biochem. biophys. Res.
Commun. 19 (1965) 412 - 416
35. Steinberg, Daniel, Charles E. Mize, Joel Avigan,
Henry M. Fales, Lorentz Eldjarn, Kenneth
Try, Oddvar Stokke and Sigvald Refsum:
Studies on the Metabolic Error in Refsum's
Disease. J. clin. Invest. 46 (1967) 313-322
36. Stoffel, W., and W. Kahlke: The transformation of
phytol into 3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic
(phytanic) acid in hereditary atactica poly-
neuriformis (Refsum's syndrome). Biochem.
biophys. Res. Commun. 19 (1965) 33 - 36
37. Wieland, O.: Diabetic acidosis: biochemical aspects.
In: On the Nature and Treatment of Diabetes,
hrsg. von B. S. Leibel und G. A. Wrenshall,
Amsterdam 1965 S. 533 - 538
38. Wieland, O.: Ketogenesis and its regulation. Advanc.
metab. Dis. 3 (1968) 1 - 47
39. Wieland, O. und I. Neufeldt: Zur Cholesterin- und
Fettsäuresynthese in der diabetischen Ratten-
leber. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 324
(1961) 101 - 107
40. Wieland, Otto, I. Neufeldt, S. Numa, F. Lynen:
Zur Störung der Fettsäuresynthese bei Hunger
und Alloxandibetes. II. Fettsäuresynthese in
der Leber alloxandibetischer Ratten. Biochem.
Z. 336 (1963) 455 - 459
41. Zak, B.: A simple rapid microtechnic for serum total
cholesterol. Amer. J. clin. Path. 27 (1957)
583 - 588

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. J. Kremer danke ich herzlich für die Stellung des Themas, die wertvollen Anregungen und die großzügig und sehr geduldig gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt auch den Herren Prof. Dr. J. Dudeck und Dr. J. Michaelis vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

LEBENS LAUF

Am 5. Juni 1944 wurde ich als viertes von fünf Kindern des Regierungsdirektors Werner Mildner und seiner Ehefrau Erika, geb. Scholz, in Trachenberg, Kreis Militsch, geboren.

1945 flüchtete unsere Familie aus Schlesien nach Halle an der Saale. Dort wurde ich 1950 in die Grundschule eingeschult.

1957 mußte unsere Familie aus politischen Gründen die DDR verlassen und gelangte nach Diez an der Lahn. Zur Fortsetzung meiner Schulausbildung kam ich im Dezember 1957 in die Untertertia des naturwissenschaftlich-mathematischen Zweiges der Tilemannschule in Limburg.

Seit Ostern 1960 besuchte ich wegen der Versetzung meines Vaters nach Mainz die Gutenbergschule in Wiesbaden, an der ich im März 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Mai 1963 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, an der ich im April 1964 und im Oktober 1965 die naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung und im Juli 1969 die ärztliche Prüfung jeweils mit dem Urteil "sehr gut" bestand.

Vom September 1969 bis August 1970 arbeitete ich als Medizinalassistent im Städtischen Krankenhaus in Frankfurt/Main-Höchst.

Seit Oktober 1969 bin ich verheiratet und wohne weiterhin in Mainz. Meine Ehefrau Anne, geb. Vorberg, ist als Lehrerin tätig.

Nach meiner Approbation als Arzt am 31. August 1970 wurde ich im Oktober 1970 zum Grundwehrdienst eingezogen, den ich als Stabsarzt in der Anaesthesieabteilung des Bundeswehrzentralkrankenhauses in Koblenz bis zum März 1972 ableiste.

